

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-106887

(43)Date of publication of application : 18.04.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12N 1/15
C12N 9/42
//(C12N 15/09
C12R 1:645)
(C12N 9/42
C12R 1:69)

(21)Application number : 10-377864

(71)Applicant : YASOGAWA DAISUKE

(22)Date of filing : 30.09.1998

(72)Inventor : YASOGAWA DAISUKE
NAGASHIMA KOJI
NAKAGAWA RYOJI
IKEDA TAKAYUKI

(54) GENE CODING FOR NDOGLUCANASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new gene which is composed of the gene coding for endoglucanase containing a specific amino acid sequence and is useful in the production of the above enzyme contributing to the effective utilization or the like of cellulose-based biomass or the improvement due to the elucidation of the specific characteristic of the enzyme.

SOLUTION: This gene is a new DNA comprising the base sequence, which codes for the amino acid sequence of formula I (wherein, X is not contained or is the leader sequence containing formula II) showing endoglucanase activity or the amino acid sequence that is obtained by adding, deleting or substituting one or plural amino acids to this amino acid sequence and shows endoglucanase activity, and is useful in the biochemical analysis and high efficient production of this enzyme contributing to the effective utilization of cellulose-based biomass and in the improvement of the specific characteristic due to the elucidation of the specific characteristic of the enzyme or the gene modification. This DNA is obtained by incubating *Corticium rolfsii* to recover the microbial cell body, extracting the RNA, preparing a cDNA library by using this RNA and then screening out it with an antiendoglucanase serum.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

30.09.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than

BEST AVAILABLE COPY

the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3089245

[Date of registration] 21.07.2000

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-106887
(P2000-106887A)

(43) 公開日 平成12年4月18日 (2000. 4. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
1/15		1/15	4 B 0 5 0
9/42		9/42	
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1: 645)			

審査請求 有 請求項の数 5 F D (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-377864

(22) 出願日 平成10年9月30日 (1998. 9. 30)

(71) 出願人 599012204

八十川 大輔

北海道江別市文京台緑町589番地4 北海道立食品加工研究センター内

(72) 発明者 八十川 大輔

北海道江別市文京台緑町589番地4 北海道立食品加工研究センター内

(72) 発明者 長島 浩二

北海道江別市文京台緑町589番地4 北海道立食品加工研究センター内

(72) 発明者 中川 良二

北海道江別市文京台緑町589番地4 北海道立食品加工研究センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エンドグルカナーゼをコードする遺伝子

(57) 【要約】

【目的】 菌類由来のエンドグルカナーゼをコードする遺伝子を提供する

【構成】 エンドグルカナーゼをもたらす、リーダー配列を含むか又は含まない特定のアミノ酸配列をコードするDNAであって、イントロンを含むか又は含まないもの；該DNAを含んで成る発現ベクター；並びに該発現ベクターにより形質転換された麹菌のごとき菌類。

【特許請求の範囲】

ノ酸配列：

【請求項1】 エンドグルカナーゼをもたらす次のアミ

X-Gln Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Ala Thr
 Ser Cys Ile Ser Gly Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asn Ser Tyr Tyr Ser Gln Cys
 Val Pro Gly Thr Ala Thr Ser Lys Thr Ala Arg Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser
 Ser Thr Gly Ser Ser Gly Ala Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Gly Val Asn Thr Ala
 Gly Tyr Asp Phe Thr Val Asp Thr Thr Gly Thr Phe Thr Gly Thr Gly Val Val
 Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Ala His Phe Ala Asn Glu Gly Ala Asn Leu Phe Arg
 Ile Pro Phe Ala Trp Gln Leu Met Thr Pro Thr Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln
 Thr Phe Phe Gln Ser Glu Tyr Asn Pro Thr Val Gln Ala Ala Leu Ala Thr Gly
 Ala Tyr Val Ile Val Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gln Ile Ile
 Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Ala Ser Ile Trp Thr Gln Leu Thr
 Ser Tyr Tyr Gly Asn Asn Pro Lys Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro His
 Asp Leu Asn Ser Ile Pro Glu Trp Ala Asp Ser Leu Gln Tyr Val Val Asn Ala
 Val Arg Ala Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Trp Ala
 Ser Ala Gln Ala Leu Pro Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Leu Leu Gln Ile Thr Asp
 Pro Leu Gly Gly Thr Asn Lys Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser
 Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Asn Cys Val Thr Asn Asn Thr Gly Val Leu Gln
 Thr His Val Thr Trp Leu Gln Gln Asn Gly Asn Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu
 Thr Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ser Ser Cys Glu Thr Tyr Val Ala Gln Glu Leu
 Ala Phe Val Gln Ala Asn Lys Asn Asn Ile Ala Gly Phe Ala Ile Trp Ala Ala
 Gly Ala Phe Asp Thr Thr Tyr Val Leu Ser Val Thr Pro Asn Ala Asp Gly Ser
 Asp Gln Pro Leu Trp Ser Ile Ala Val Lys Pro Tyr Leu Pro (配列中、x は存
 在しないか、または次のアミノ酸配列：Met Phe Ile Pro Ile Ala Leu Val Ala
 Leu Ala Ala Ser Val Val Asn Ala を有するリーダー配列を示す)、又は該アミ
 ノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が付加、欠失もしくは置換されて
 おり且つエンドグルカナーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列、をコードして
 いる塩基配列を含んで成るDNA。

【請求項2】 イントロンを含有している特許請求の範囲第1項に記載のDNA。

のDNA。

【請求項3】 イントロンを含有することなく前記アミノ酸配列をコードしている特許請求の範囲第1項に記載

【請求項4】 エンドグルカナーゼをもたらす次のアミノ酸配列：

X-Gln Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Ala Thr
 Ser Cys Ile Ser Gly Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asn Ser Tyr Tyr Ser Gln Cys
 Val Pro Gly Thr Ala Thr Ser Lys Thr Ala Arg Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser
 Ser Thr Gly Ser Ser Gly Ala Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Gly Val Asn Thr Ala
 Gly Tyr Asp Phe Thr Val Asp Thr Thr Gly Thr Phe Thr Gly Thr Gly Val Val
 Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Ala His Phe Ala Asn Glu Gly Ala Asn Leu Phe Arg
 Ile Pro Phe Ala Trp Gln Leu Met Thr Pro Thr Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln
 Thr Phe Phe Gln Ser Glu Tyr Asn Pro Thr Val Gln Ala Ala Leu Ala Thr Gly
 Ala Tyr Val Ile Val Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gln Ile Ile
 Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Ala Ser Ile Trp Thr Gln Leu Thr
 Ser Tyr Tyr Gly Asn Asn Pro Lys Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro His
 Asp Leu Asn Ser Ile Pro Glu Trp Ala Asp Ser Leu Gln Tyr Val Val Asn Ala
 Val Arg Ala Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Trp Ala
 Ser Ala Gln Ala Leu Pro Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Leu Leu Gln Ile Thr Asp
 Pro Leu Gly Gly Thr Asn Lys Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser
 Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Asn Cys Val Thr Asn Asn Thr Gly Val Leu Gln
 Thr His Val Thr Trp Leu Gln Gln Asn Gly Asn Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu
 Thr Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ser Ser Cys Glu Thr Tyr Val Ala Gln Glu Leu

Ala Phe Val Gln Ala Asn Lys Asn Asn Ile Ala Gly Phe Ala Ile Trp Ala Ala
Gly Ala Phe Asp Thr Thr Tyr Val Leu Ser Val Thr Pro Asn Ala Asp Gly Ser
Asp Gln Pro Leu Trp Ser Ile Ala Val Lys Pro Tyr Leu Pro (配列中、x は存
在しないか、または次のアミノ酸配列: Met Phe Ile Pro Ile Ala Leu Val Ala
Leu Ala Ala Ser Val Val Asn Ala を有するリーダー配列を示す)、又は該アミ
ノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されてお
り且つエンドグルカナーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列、をコードしてい
る塩基配列を含んで成る発現ベクター。

【請求項5】 エンドグルカナーゼをもたらす次のアミノ酸配列:

X-Gln Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Ala Thr
Ser Cys Ile Ser Gly Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asn Ser Tyr Tyr Ser Gln Cys
Val Pro Gly Thr Ala Thr Ser Lys Thr Ala Arg Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser
Ser Thr Gly Ser Ser Gly Ala Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Gly Val Asn Thr Ala
Gly Tyr Asp Phe Thr Val Asp Thr Thr Gly Thr Phe Thr Gly Thr Gly Val Val
Pro Pro Ala Ser Gln Tyr Ala His Phe Ala Asn Glu Gly Ala Asn Leu Phe Arg
Ile Pro Phe Ala Trp Gln Leu Met Thr Pro Thr Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln
Thr Phe Phe Gln Ser Glu Tyr Asn Pro Thr Val Gln Ala Ala Leu Ala Thr Gly
Ala Tyr Val Ile Val Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gln Ile Ile
Gly Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Ala Ser Ile Trp Thr Gln Leu Thr
Ser Tyr Tyr Gly Asn Asn Pro Lys Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro His
Asp Leu Asn Ser Ile Pro Glu Trp Ala Asp Ser Leu Gln Tyr Val Val Asn Ala
Val Arg Ala Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Trp Ala
Ser Ala Gln Ala Leu Pro Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Leu Leu Gln Ile Thr Asp
Pro Leu Gly Gly Thr Asn Lys Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser
Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Asn Cys Val Thr Asn Asn Thr Gly Val Leu Gln
Thr His Val Thr Trp Leu Gln Gln Asn Gly Asn Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu
Thr Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ser Ser Cys Glu Thr Tyr Val Ala Gln Glu Leu
Ala Phe Val Gln Ala Asn Lys Asn Asn Ile Ala Gly Phe Ala Ile Trp Ala Ala
Gly Ala Phe Asp Thr Thr Tyr Val Leu Ser Val Thr Pro Asn Ala Asp Gly Ser
Asp Gln Pro Leu Trp Ser Ile Ala Val Lys Pro Tyr Leu Pro (配列中、x は存
在しないか、または次のアミノ酸配列: Met Phe Ile Pro Ile Ala Leu Val Ala
Leu Ala Ala Ser Val Val Asn Ala を有するリーダー配列を示す)、又は該アミ
ノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換されてお
り且つエンドグルカナーゼの酵素活性をもたらすアミノ酸配列、をコードしてい
る塩基配列を含んで成る発現ベクターにより形質転換された麹菌のごとき菌類。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 この発明はグルカナーゼをコードする遺伝子、該遺伝子を含んで成る発現ベクター、及び該発現ベクターにより形質転換された宿主に関する。

【0002】

【従来の技術】 セルロースはグルコースが β -1, 4-グリコシド結合でつながった高分子多糖で、地球上でも豊富な再生可能な資源であり、木材および草材料の主要な構成成分である。使用済み紙製品、及び農産物の副産物に大量に含まれるセルロースを加水分解すればグルコースが得られる。しかし、セルロースは難分解性の物質であり、セルロース系バイオマスの有効利用は実用にまでは至っていない。このセルロースを効率よく加水分解する酵素がセルラーゼである。セルラーゼの生化学

的解析および本酵素を効率よく生産することはセルロース系バイオマスの有効利用に必要不可欠である。

【0003】 セルラーゼはエンドグルカナーゼ、セロビオヒドロラーゼ、 β -グルコシダーゼの3種の酵素系に大別され、これら酵素がセルロースに対し相乗的に作用してセルロースを効率よく分解するとされている。このうちエンドグルカナーゼは広い基質特異性を有し、セルロース鎖中の内部グリコシド結合を加水分解する。

【0004】 セルラーゼは、多岐にわたる微生物によって生産されており、それぞれのセルラーゼの至適温度、至適pH、基質特異性、生成物のかたよりのなどの特性の差から、その利用目的に応じて産業用酵素剤として洗剤、飼料添加剤、消化剤などの製品の主要成分として用いられている。しかし、目的によっては微生物から得られる酵素成分の組成や特性が必ずしも適切でない場合も

あり、セルラーゼの特性解明は実用面でも期待されている。

【0005】これらセルラーゼ成分のそれぞれの遺伝子を単離し、遺伝子工学的に利用することも検討されている。遺伝子工学の手法を用いることにより、精製度の高い酵素が取得可能となり、しかも酵素の特性解明や遺伝子改変による特性改良が可能になると考えられる。

【発明の目的】

【0006】今回本発明者らは、コルティシウム・ロルフシイ (*Corticium rolfsii*) からエンドグルカナーゼの cDNA を単離し、その遺伝子から発現されるエンドグルカナーゼを確認した。この発明は本菌類に由来する上記ポリペプチドをコードするセルラーゼ酵素遺伝子配列を提供する。更に、本発明の目的は上記セルラーゼ酵素遺伝子配列を含む組換えプラスミドを提供することにある。また、本発明の目的は上記遺伝子配列を含み発現コントロール配列に発現可能な状態で連結された組換えプラスミドにより形質転換された麹菌のごとき組換え微生物を提供することにある。

【発明の具体的説明】

【0007】本発明によって提供される遺伝子にコードされるタンパク質は、配列表 1 に記載される配列の 1 部又は全部を有するものである。また、前記タンパク質の誘導体としては、例えばアミノ酸の付加、挿入、削除、欠失または置換などの改変が生じた配列表 1 に記載されるアミノ酸配列を有するタンパク質であって、しかもセルラーゼ活性を依然として保持するものが挙げられる。

【0008】本発明によって提供される遺伝子にコードされるタンパク質は、配列表 1 に記載されるアミノ酸配列の 1～373 番までの配列からなるものであるが、また、この配列の N 末端に更に配列表 1 の -17～-1 番までのアミノ酸配列を有するタンパク質も本発明に包含される。

【0009】これらの遺伝子にコードされるタンパク質は *C. ロルフシイ* に由来するものであり、この配列表 1 の 1～373 番までの配列を有するタンパク質は成熟タンパク質であり、-17～-1 番の配列はシグナルペプチドと考えられる。この 373 アミノ酸に基づく分泌されたタンパク質は約 40,000 ドルトンの分子量を有する。天然タンパク質は、宿主により生産された場合、ある程度のグリコシル化を含むことが知られている。

【0010】本発明によって提供される DNA 配列は、典型的には配列表 2 に記載される塩基配列の一部または全部を有するものである。

【0011】配列表 2 に記載される塩基配列は *C. ロルフシイ* のエンドグルカナーゼ cDNA を表したものである。配列表 2 に記載される塩基配列は、27 残基目の ATG で始まり、塩基配列番号 1199 残基目までの TAA で終了するオープンリーディングフレーム (読みとり枠) を有する。また、78 残基目～1196 残基目の塩

基配列は前記成熟タンパク質に対応する。

【0012】タンパク質のアミノ酸配列が与えられれば、それをコードする DNA 配列は容易に定まり、配列表 1 に記載されるアミノ酸配列の全部又は一部をコードする種々の塩基配列を選択することができる。従って、本発明による配列表 1 に記載されるアミノ酸配列の一部又は全部をコードする DNA 配列とは配列表 2 に記載される一部又は全部の塩基配列に加え、同一のアミノ酸をコードする塩基配列であって縮重関係にあるコドン塩基配列として有する配列も意味するものとする。

【0013】本発明によって提供されるエンドグルカナーゼをコードする遺伝子の塩基配列は、コルティシウム属 (*Corticium*) では初めて解明されたもので、独自性を有する。

【0014】本発明による DNA は天然由来のものであっても全合成したものであっても良い。また、天然由来のものの一部を利用して合成を行ったものであっても良い。DNA の典型的な取得方法としては *C. ロルフシイ* 由来の染色体ライブラリーまたは cDNA ライブラリーから遺伝子工学の分野で慣用されている方法、例えば部分アミノ酸配列の情報を基にして作製した適当な DNA プローブを用いてスクリーニングを行う方法、部分塩基配列の情報を基にして作製した適当な DNA プライマーを用いて PCR により DNA を増幅する方法などが挙げられる。

【0015】本発明による DNA は以下のようにして決定した。

(1) cDNA ライブラリーの作製

C. ロルフシイ をセルラーゼを発現・誘導する培地にて培養し、集菌して菌体を取得した。この菌体より mRNA を調製し、市販されている cDNA 合成キットを用いて合成した後、市販発現ベクターに導入して cDNA ライブラリーを作製した。

【0016】(2) 抗エンドグルカナーゼ血清の調製

C. ロルフシイ を同様のセルラーゼ誘導培地にて培養し、カルボキシメチルセルロース分解活性を指標として、培養上清を種々のカラムクロマトグラフィーを用いてエンドグルカナーゼを粗精製した。次いで、このエンドグルカナーゼを SDS-ポリアクリルアミド電気泳動し、クマシー・ブリリアント・ブルーを用いて染色し、バンドをゲルごと破碎してアジュバントと共にウサギに皮下注射した。常法により血清を分画し、ウサギ抗エンドグルカナーゼ血清とした。

【0017】(3) セルラーゼ遺伝子のクローン化

上記 (1) により得られた cDNA ライブラリー (例えばファージ DNA ライブラリー) を大腸菌に感染させ、生じたプラークを IPTG を染み込ませたニトロセルロースメンブレンへブロットした。上記 (2) により得られた抗血清と反応させ、抗ウサギ IgG を含む市販キットを用いてウサギ抗エンドグルカナーゼ抗体と反応した

陽性ブランクを選択した。

【0018】(4) 塩基配列の決定

上記のようにして選択されたクローン(計6個)についてDNAを調製し、常法に従い(例えば、DNAシーケンサーを用いて)塩基配列を決定した。その結果、4クローンが5'側の位置は異なるものの、同一の塩基配列を示した。

【0019】発現ベクター及び形質転換された微生物
また、本発明によれば、前記の本発明によるDNA配列を宿主微生物内で複製可能でかつそのDNA配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。又は、大腸菌内で複製可能で、適当な宿主の染色体DNA内に組み込まれ、その宿主微生物内でそのDNA配列がコードするタンパク質を発現可能な状態で含んでなる発現ベクターが提供される。更に、本発明によれば、この発現ベクターによって形質転換された微生物が提供される。この宿主-ベクター系は特に限定されず、例えば、大腸菌、放線菌、枯草菌、酵母、カビなどを用いた系、およびそれらを用いた他のタンパク質との融合タンパク質発現系などを用いることができる。本発明によるベクター構築の手順及び方法は、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

【0020】本発明による発現ベクターは、これを実際に宿主微生物に導入して所望のタンパク質を発現させるためには、前記の本発明によるDNA配列の他に、その発現を制御するDNA配列や微生物を選択するための遺伝子マーカーを含んでいてもよい。また、この発現ベクターはセルラーゼをコードするDNA配列を反復した形(タンデム)で含んでいてもよい。これらは常法に従い発現ベクターに存在させてよく、このベクターによる微生物の形質転換の方法も、この分野で慣用されているものを用いることができる。

【0021】この形質転換体を適当な培地で培養し、その培養物から上記した本発明によるタンパク質を単離して得ることができる。従って、本発明の別の態様によれば、前記の本発明による新規タンパク質の製造法が提供される。形質転換体の培養及びその条件は、使用する微生物についてのそれと本質的に同様であってよい。また、培養液からの本発明による新規タンパク質の回収、精製も常法に従って行うことができる。

【0022】

【実施例】(1) cDNAライブラリーの作製

C. ロルフシイを下記の組成のセルラーゼ誘導(CI)培地中で30℃、2日間培養した。CI培地の組成: アビセル(0.4%)、ポリペプトン(1.0%)、酵母エキス0.5%、硫酸アンモニウム(0.14%)、硫酸マグネシウム・7水和物(0.03%)、尿素(0.03%)、Tween 80(0.05%)。培養後、遠心分離(5000rpm, 10分)により菌体を回収

し、アイソジェン(ニッポンジーン社製)中でポリトロンを用いて菌体を破壊しRNAを抽出した。残存アビセルを含む湿菌体重量として8.2gを使用し、1.4mgのRNAを得た。このうち1mgのRNAを用いて、オリゴテックスdT-30スーパー(宝酒造)に吸着させることにより5.8μgのmRNAを精製した。ZAP-cDNA合成キット(ストラタジーン社製)を用いてcDNAを調製し、1.2μgのcDNAを取得した。キット内のλZAPIIにライゲーションし、Giga-pack Goldパッケージングエキストラクト(ストラタジーン社製)を用いてラムダファージにパッケージし、得られたファージを大腸菌XL1-Blue MRF'株に感染させた。

【0023】(2) 抗エンドグルカナーゼ血清の調製
上記CI培地中で30℃、7日間培養後、得られた培養液を8000rpmで10分間遠心し菌体を除いた。得られた培養上清を限外ろ過により濃縮、10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)にバッファー交換し、DEAEトヨパールカラムに適用した。非吸着画分を分離し、硫酸アンモニウムを1.0Mとなるように溶解、ブチルトヨパールカラムに適用した。1.0~0Mの濃度勾配をかけた硫酸アンモニウム溶液で溶出し、活性画分を分離した。活性はCMCを基質とし、還元糖の遊離をソモジー・ネルソン法(Somogyi, M. J. J. Biol. Chem. (1952) 195, 19)で測定した。クロマトグラフ処理したエンドグルカナーゼはSDS-PAGEにより分析した。電気泳動的に分離したタンパク質はクマシー・ブリリアント・ブルーR-250で染色し、検出した。このバンド100μg相当分をゲルから切り出し、ゲルごとシリンジ中で細かく破碎、フロイント完全アジュバントと混合しウサギの背中および腿に4~5カ所に分けて皮下注射した。2週間後、約1/2量のグルカナーゼを電気泳動し、同様にバンドを破碎、フロイント不完全アジュバントと混合、同様に皮下注射した。10日後静脈血約25mlを分取し、遠心により血餅を除き抗エンドグルカナーゼ血清とした。

【0024】(3) セルラーゼ遺伝子のクローン化
上記大腸菌XL1-Blue MRF'株に、シャーレあたり約20000ブランクとなるように常法によりファージライブラリーを感染させ、42℃で3.5時間培養した。直前に10mMのIPTGを染み込ませたニトロセルロースメンブレンをブランクの出現したシャーレに乗せ、37℃で3.5時間培養した。メンブレンをはがし、Vectastain ABCキット(フナコシ株式会社)の説明書に基づきメンブレンを洗浄し、上記ウサギ抗エンドグルカナーゼ血清および二次抗体としての抗ウサギIgGを用いて陽性クローンをスクリーニングした。メンブレン上のスポットと合致するブランクをシャーレから打ち抜き、再スクリーニングにかけた。

【0025】(4) 目的遺伝子のサブクローン化

6個の陽性ブランクを選抜し、ZAP-cDNA合成キットの説明書に従いpBluescript SK (+)プラスミドにサブクローン化した。

【0026】(5)塩基配列の決定

塩基配列解析装置はDNAシーケンサー373A (PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いた。塩基配列解読反応はダイターミネーター・サイクル・シーケンシング・キット (PEアプライドバイオシステムズ社製)で、GeneAmp PCR システム2400 (PEアプライドバイオシステムズ社製)を用いて行った。ゲル作製条件、反応条件、泳動条件などは各説明書の詳細を参照した。解読できた塩基配列を基に順次オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、+鎖と-鎖の両方の全長を解読した。

【0027】(7)組換えプラスミドの調製

取得したDNA配列にコードされている遺伝子にセルラーゼ活性があることを確認するため、pBluescript SK (+)に組み込まれた本DNAをEcoRIで消化し、約1.4 kbのDNA断片を回収した。pBluescript SK- (ストラタジーン社製)由来で、アスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) argBの遺伝子を有し、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*) pgkA遺伝子のプロモーターとターミネーターの間に唯一EcoRI認識切断部位のあるプラスミドpBPT (国立醸造試験所よりの分与)に順向きに本エンドグルカナーゼ遺伝子を導入した。

【0028】(8)エンドグルカナーゼ遺伝子の発現 (1)

アルギニン要求性のA.オリゼーM-2-3株 (Gomi, K. Agric. Biol. Chem. (1987) 51, 2549)をDP培地中で30℃で培養した。DP培地の組成: デキストリン (2.0%)、ポリペプトン (1.0%)、硫酸マグネシウム・7水和物 (0.05%)、硝酸ナトリウム (0.1%)、リン酸二水素カリウム (0.5%)、pH 6.0。20時間培養後、3000 rpm、10分間の遠心によって菌体を集め、0.45 μmのフィルターでろ過したプロトプラスト化酵素溶液 (5 mg/ml Novozyme 234, 5 mg/ml Cellulase Onozuka R-10, 0.8 M塩化ナトリウム、10 mMリン酸ナトリウム緩衝液 pH 6.0) 30 mlに懸濁した。室温で2~4時間ゆっくり振盪し、プロトプラスト化させた。滅菌したペーパータオルでろ過し、2000 rpmで10分遠心してプロトプラストを回収した。上清を捨てて0.8 M塩化ナトリウム溶液で2回洗浄し、2000 rpmで5分間遠心した。更に緩衝液I (0.8 M塩化ナトリウム、10 mM塩化カルシウム、10 mMトリス塩酸 pH 7.5) で洗浄し、2000 rpmで5分

配列番号: 1

間遠心した。プロトプラストを2.5 × 10の8乗/mlとなるように、最終容量の4/5の緩衝液Iに懸濁し、1/5量の緩衝液II (40%ポリエチレングリコール4000、50 mM塩化カルシウム、50 mMトリス塩酸 pH 7.5) および1/100量のジメチルスルホキシドを加えて混合し、0.2 mlずつマイクロチューブに分注し、形質転換用プロトプラストとした。この形質転換用プロトプラスト懸濁液0.2 mlに1 μg/μlのプラスミド溶液10 μlを添加、充分混合後30分間氷冷した。1 mlの緩衝液IIを加えて良く混合し、室温で20分間放置したのち10 mlの緩衝液Iで希釈した。4℃、2000 rpmで5分間遠心してプロトプラストを回収し、2 mlの緩衝液Iに懸濁して1 mlずつCD培地 (CD培地の組成は、硝酸ナトリウム0.2%、リン酸水素二カリウム0.1%、硫酸マグネシウム・7水和物0.05%、塩化カリウム0.05%、硫酸鉄0.001%、しょ糖3.0%、寒天2%、pH 5.5) にのせ、30℃で培養した。7日間培養後アルギニン非要求性コロニーを釣菌し、GPM培地に接種、30℃、3日間培養した。培養上清をSDS-PAGEに供したところ48 kDaの強いバンドを検出した。この48 kDaタンパク質は、上記(3)セルラーゼ遺伝子のスクリーニングで用いたウサギ抗エンドグルカナーゼ血清と反応した。本培養上清に、0.22~0.29 ユニット/mlのCMCase活性を検出した。対照標品の本グルコアミラーゼ遺伝子を組み込まないpBPTプラスミドのみで形質転換したA.オリゼー株P-1の同様の培養上清にはCMCase活性を認めなかった。図1中(a)のパネルのレーン1および2は、それぞれ対照菌株のpBPTのみで形質転換した株、及び本グルコアミラーゼ遺伝子形質転換体C-1のゲノムDNAのEcoRI消化物のアガロースゲル電気泳動のパターンで、図1(b)はそのサザン解析の結果である。プローブは本グルコアミラーゼ遺伝子を用いた。図1で明かであるように、本グルコアミラーゼ遺伝子形質転換体にのみ約1.4 kbに相当するシグナルが検出できた。図2(a)は上記(2)抗エンドグルカナーゼ血清の調製に用いたC.ロルフシイ培養上清の粗精製標品のSDS-PAGEの結果、(b)レーン2はP-1株のGPM培地中、30℃、3日間培養の培養上清、レーン3は対照菌株C-1の培養上清、(c)レーン2およびレーン3は、同様にそれぞれP-1株およびC-1株培養上清のウエスタンブロット解析の結果である。図2の(a)及び(b)の結果よりC-1株で発現されたタンパク質は見かけ上C.ロルフシイ培養上清中のエンドグルカナーゼより高分子化していた。

【0029】

【配列表】

配列の長さ: 390

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: タンパク質

Met Phe Ile Pro Ile Ala Leu Val Ala Leu Ala Ala Ser Val Val Asn Ala Gln
 -15 -10 -5 1
 Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ser Cys
 5 10 15
 Ile Ser Gly Tyr Tyr Cys Gln Ala Gln Asn Ser Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro
 20 25 30 35
 Gly Thr Ala Thr Ser Lys Thr Ala Arg Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser Ser Thr
 40 45 50 55
 Gly Ser Ser Gly Ala Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Gly Val Asn Thr Ala Gly Tyr
 60 65 70
 Asp Phe Thr Val Asp Thr Thr Gly Thr Phe Thr Gly Thr Gly Val Val Pro Pro
 75 80 85 90
 Ala Ser Gln Tyr Ala His Phe Ala Asn Glu Gly Ala Asn Leu Phe Arg Ile Pro
 95 100 105
 Phe Ala Trp Gln Leu Met Thr Pro Thr Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Thr Phe
 110 115 120 125
 Phe Gln Ser Glu Tyr Asn Pro Thr Val Gln Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Tyr
 130 135 140 145
 Val Ile Val Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gln Ile Ile Gly Gln
 150 155 160
 Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Ala Ser Ile Trp Thr Gln Leu Thr Ser Tyr
 165 170 175 180
 Tyr Gly Asn Asn Pro Lys Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro His Asp Leu
 185 190 195
 Asn Ser Ile Pro Glu Trp Ala Asp Ser Leu Gln Tyr Val Val Asn Ala Val Arg
 200 205 210 215
 Ala Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Leu Leu Pro Gly Ser Ser Trp Ala Ser Ala
 220 225 230 235
 Gln Ala Leu Pro Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Leu Leu Gln Ile Thr Asp Pro Leu
 240 245 250
 Gly Gly Thr Asn Lys Leu Ile Phe Asp Val His Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn
 255 260 265 270
 Ser Gly Thr His Ser Asn Cys Val Thr Asn Asn Thr Gly Val Leu Gln Thr His
 275 280 285
 Val Thr Trp Leu Gln Gln Asn Gly Asn Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu Thr Gly
 290 295 300 305
 Gly Gly Ser Ser Asp Ser Ser Cys Glu Thr Tyr Val Ala Gln Glu Leu Ala Phe
 310 315 320 325
 Val Gln Ala Asn Lys Asn Asn Ile Ala Gly Phe Ala Ile Trp Ala Ala Gly Ala
 330 335 340
 Phe Asp Thr Thr Tyr Val Leu Ser Val Thr Pro Asn Ala Asp Gly Ser Asp Gln
 345 350 355 360
 Pro Leu Trp Ser Ile Ala Val Lys Pro Tyr Leu Pro
 365 370

【0030】

配列番号: 2

配列の長さ : 1372

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : complementary DNA

起源

生物名 : C. ロルフシイ (Corticium rolfsii)

配列の特徴

特徴を表す記号 : sig peptide

存在位置 : 27..77

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 78..1196

特徴を表す記号 : cleavage-site

存在位置 : 318..323

他の情報 : KpnI

特徴を表す記号 : cleavage-site

存在位置 : 519..524

他の情報 : SalI

特徴を表す記号 : cleavage-site

存在位置 : 840..845

他の情報 : KpnI

```

CTGGTTCTCT CATCTCAACT TACAAA ATG TTC ATT CCC ATT GCA CTA GTT GCA    53
                               Met Phe Ile Pro Ile Ala Leu Val Ala
                               -15                -10
TTA GCT GCC AGC GTG GTG AAT GCA CAA CAG TCT GCG TGG GGA CAA TGT GGT    104
Leu Ala Ala Ser Val Val Asn Ala Gln Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly
                               -5                1                5
GGT CAG GGC TGG ACT GGT GCC ACT TCT TGT ATC TCT GGT TAT TAC TGC CAA    155
Gly Gln Gly Trp Thr Gly Ala Thr Ser Cys Ile Ser Gly Tyr Tyr Cys Gln
    10                15                20                25
GCG CAG AAC TCT TAC TAT AGT CAA TGT GTT CCT GGA ACT GCA ACT TCG AAG    206
Ala Gln Asn Ser Tyr Tyr Ser Gln Cys Val Pro Gly Thr Ala Thr Ser Lys
    30                35                40
ACG GCG AGG TCT ACG TCC ACA GCA CCA AGC AGC ACT GGA AGC TCC GGA GCC    257
Thr Ala Arg Ser Thr Ser Thr Ala Pro Ser Ser Thr Gly Ser Ser Gly Ala
    45                50                55                60
CGT CTG CCA TAT CTC GGT GGT GTA AAC ACG GCT GGT TAT GAT TTC ACC GTG    308
Arg Leu Pro Tyr Leu Gly Gly Val Asn Thr Ala Gly Tyr Asp Phe Thr Val
    65                70                75
GAT ACC ACC GGT ACC TTC ACT GGA ACT GGT GTT GTT CCC CCT GCA TCG CAA    359
Asp Thr Thr Gly Thr Phe Thr Gly Thr Gly Val Val Pro Pro Ala Ser Gln
    80                85                90
TAT GCT CAC TTT GCC AAC GAG GGT GCC AAT CTC TTC CGT ATT CCT TTC GCT    410
Tyr Ala His Phe Ala Asn Glu Gly Ala Asn Leu Phe Arg Ile Pro Phe Ala
    95                100                105                110
TGG CAA TTG ATG ACT CCC ACT CTC GGT GGT AGC ATT AAC CAA ACC TTC TTC    461
Trp Gln Leu Met Thr Pro Thr Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Thr Phe Phe
    115                120                125
CAG TCC GAG TAC AAC CCA ACC GTC CAG GCT GCT CTG GCC ACC GGT GCT TAC    512
Gln Ser Glu Tyr Asn Pro Thr Val Gln Ala Ala Leu Ala Thr Gly Ala Tyr

```

```

130          135          140          145
GTC ATC GTC GAC TTG CAC AAC TAT GCT CGA TGG AAC GGC CAG ATC ATT GGC 563
Val Ile Val Asp Leu His Asn Tyr Ala Arg Trp Asn Gly Gln Ile Ile Gly
          150          155          160
CAG GGT GGT CCG ACA AAC GCA CAA TTT GCC TCG ATC TGG ACT CAG CTC ACG 614
Gln Gly Gly Pro Thr Asn Ala Gln Phe Ala Ser Ile Trp Thr Gln Leu Thr
          165          170          175
TCC TAC TAC GGC AAC AAC CCT AAA GTC ATC TTT GGC TTG ATG AAC GAG CCT 665
Ser Tyr Tyr Gly Asn Asn Pro Lys Val Ile Phe Gly Leu Met Asn Glu Pro
180          185          190          195
CAT GAT CTC AAT TCA ATC CCC GAG TGG GCG GAC AGT CTC CAA TAC GTC GTC 716
His Asp Leu Asn Ser Ile Pro Glu Trp Ala Asp Ser Leu Gln Tyr Val Val
          200          205          210
AAC GCC GTT CGT GCG GCC GGC TCG ACG AAC TAC CTC CTC TTA CCC GGT TCT 767
Asn Ala Val Arg Ala Ala Gly Ser Thr Asn Tyr Leu Leu Leu Pro Gly Ser
          215          220          225          230
TCC TGG GCT AGC GCA CAG GCA CTC CCG ACC GAG GCC GGA CCT TAC CTC CTC 818
Ser Trp Ala Ser Ala Gln Ala Leu Pro Thr Glu Ala Gly Pro Tyr Leu Leu
          235          240          245
CAA ATC ACT GAT CCT CTT GGC GGT ACC AAC AAA CTC ATT TTC GAT GTG CAC 869
Gln Ile Thr Asp Pro Leu Gly Gly Thr Asn Lys Leu Ile Phe Asp Val His
          250          255          260
AAG TAC CTC GAC AGC GAC AAC AGT GGC ACC CAC TCC AAC TGC GTT ACG AAC 920
Lys Tyr Leu Asp Ser Asp Asn Ser Gly Thr His Ser Asn Cys Val Thr Asn
265          270          275          280
AAC ACT GGT GTC CTT CAG ACG CAC GTG ACC TGG CTC CAG CAG AAT GGC AAC 971
Asn Thr Gly Val Leu Gln Thr His Val Thr Trp Leu Gln Gln Asn Gly Asn
          285          290          295
CGT CAG GCG CTT CTG AGC GAG ACT GGT GGA GGT AGC TCT GAC AGC AGT TGC 1022
Arg Gln Ala Leu Leu Ser Glu Thr Gly Gly Gly Ser Ser Asp Ser Ser Cys
300          305          310          315
GAG ACA TAT GTT GCC CAA GAG CTT GCA TTC GTT CAA GCC AAC AAG AAT AAC 1073
Glu Thr Tyr Val Ala Gln Glu Leu Ala Phe Val Gln Ala Asn Lys Asn Asn
          320          325          330
ATT GCC GGC TTT GCC ATC TGG GCC GCA GGT GCA TTC GAC ACG ACA TAC GTC 1124
Ile Ala Gly Phe Ala Ile Trp Ala Ala Gly Ala Phe Asp Thr Thr Tyr Val
          335          340          345
CTT AGC GTC ACC CCG AAC GCG GAC GGC TCG GAT CAG CCC CTC TGG TCT ATT 1175
Leu Ser Val Thr Pro Asn Ala Asp Gly Ser Asp Gln Pro Leu Trp Ser Ile
350          355          360          365
GCC GTC AAA CCT TAT CTG CCT TAAGAAACCT AATCTATTCA AAATCACCAA 1226
Ala Val Lys Pro Tyr Leu Pro
          370
TTGAAGTGAA TAAGAGCCAA TGGTTTCTTC TATATATATT TAGTTGTTTA 1276
TCATGGAAAA AAATCCCGTT GTCGTTTGTG TATTAGATAT TTTGGAGAAA 1326
AGTCAATTTA TTTGGTTTCT TGCTCTCCA AAAAAAAAAA AAAAAA 1372

```

【0031】

【発明の効果】この発明はC. ロルフシイに由来する特定のポリペプチドをコードするセルラーゼ遺伝子を提供する。更に、本発明は該セルラーゼ酵素遺伝子配列を含

む組換えプラスミドを提供する。また、該遺伝子配列を含み発現コントロール配列に発現可能な状態で連結された組換えプラスミドにより形質転換された麹菌のごとき組換え微生物を提供する。

【0032】本酵素の生化学的解析及び高効率生産はセルロース系バイオマスの有効利用に資するものである。遺伝子工学の手法を用いることにより、精製度の高い酵素が取得可能となり、しかも酵素の特性解明や遺伝子改変による特性改良が可能になると考えられる。

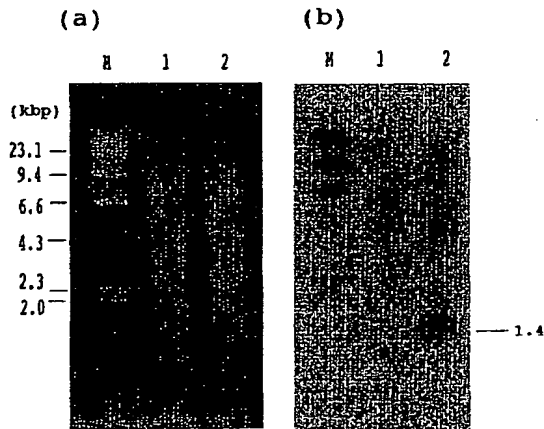
【図面の簡単な説明】

【図1】(a)は、本エンドグルカナーゼ遺伝子形質転換体及び対照菌株由来ゲノムDNAのEcoRI消化物のアガロースゲル電気泳動の結果である。(b)は、そ

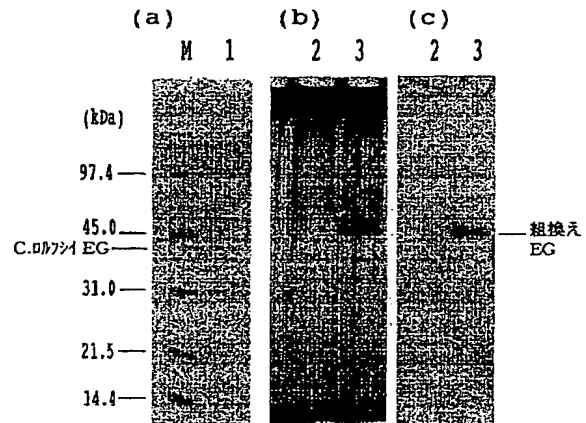
のサザン解析の結果である。プローブは本エンドグルカナーゼ遺伝子を用いた。

【図2】(a)は、C. ロルフシイ培養上清に含まれる本エンドグルカナーゼタンパク質のSDS-PAGEの結果、(b)は、本エンドグルカナーゼ遺伝子形質転換体及び対照菌株の発現培地での培養上清のSDS-PAGEの結果、(c)は、本エンドグルカナーゼ遺伝子形質転換体及び対照菌株の発現したタンパク質のウエスタン解析の結果である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

(C 1 2 N 9/42

C 1 2 R 1:69)

識別記号

F 1

テマコード (参考)

(72) 発明者 池田 隆幸

北海道江別市文京台緑町589番地4 北海道立食品加工研究センター内

F ターム (参考) 4B024 AA03 AA05 BA12 CA04 DA11

EA04 GA11 HA01

4B050 CC03 DD03 LL05